DOI:10.11931/guihaia.gxzw201901024

不同甜叶菊品种叶中绿原酸类成分的比较研究

郭志龙，马治华，张虹，陈任，张自萍*

（宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室， 银川 750021）

摘要：以 14 个扦插培育的甜叶菊品种叶为试验材料，首先从 8 种不同型号的树脂中筛选出一种合适的大孔吸附树脂对甜叶菊叶中绿原酸类成分进行纯化前处理，然后采用 HPLC 法对不同甜叶菊品种叶中所含绿原酸类成分进行比较分析，以期筛选出绿原酸类物质含量较高的甜叶菊品种，为扩大甜叶菊的开发利用提供依据。结果表明：在 8 种不同型号的树脂中，XAD-16 对甜叶菊叶中绿原酸类成分吸附-解析性能最佳；经优化，上样液浓度 1.20 mg·mL^{-1}、样品溶液 pH 3、解析液乙醇体积分数 70%时 XAD-16 树脂对甜叶菊叶中绿原酸类成分具有较好的纯化效果；HPLC 检测分析表明，在 14 个品种中共检测出新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 六种绿原酸类成分，其中主要成分均为异绿原酸 A、绿原酸、异绿原酸 C，而在品种 3、5、13、14 中没有检测出异绿原酸 B；14 个品种中 6 个绿原酸类成分的含量分别为异绿原酸 A 20.55~54.3 mg·g^{-1}、绿原酸 17.96~32.93 mg·g^{-1}、异绿原酸 C 4.15~19.49 mg·g^{-1}、新原酸 0.61~4.61 mg·g^{-1}、隐绿原酸 0.52~3.11 mg·g^{-1}、异绿原酸 B 0.0~3.17 mg·g^{-1}，6 种绿原酸类成分总量为 43.9~97.8 mg·g^{-1}。可见，不同品种甜叶菊叶中绿原酸类成分含量有明显差异，富含绿原酸类成分的甜叶菊品种可用于开发获取绿原酸类物质。

关键词 甜叶菊，绿原酸类成分，甜叶菊叶，XAD-16 树脂

中图分类号： 文献标识码：A 文章编号：

Variation of chlorogenic acids in leaves of various *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivars

GUO Zhilong, MA Zhihua, ZHANG Hong, CHEN Ren, ZHANG Ziping*

（ *Key Laboratory of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Special Biological Resources in the Western*, *Ningxia University,* Yinchuan 750021, China ）

Abstract: The leaves of 14 *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties cultured by cuttings were used as experimental materials. Firstly, a suitable macroporous adsorption resin was screened from 8 different types of resins to purify chlorogenic acid components in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. Then, the chlorogenic acid components contained in the leaves of different *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties were compared and analyzed by HPLC in order to screen the *Stevia*

基金项目：宁夏大学引进人才科研启动项目（BQC2012001）[Supported by Ningxia University Introduced Talent research Start-up Program (BQC2012001)]。

作者简介：郭志龙（1993-），男，山西省临汾市人，硕士，研究方向为天然产物研究与开发，（E-mail）1793812497@qq.com。

*__通信作者__：张自萍（1970-），博士，教授，研究方向为天然产物研究与开发，（E-mail）zipingzhang@163.com。

rebaudiana Bertoni with high chlorogenic acid contents. The results revealed that among the eight tested resins, XAD-16 showed much better adsorption/desorption capacity for chlorogenic acid components, and XAD-16 resin had better purification effect on the chlorogenic acid components in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni when the concentration of sample solution was 1.20 mg·g^{-1} with pH 3 and 70% (v/v) ethanol used as desorption solution. HPLC analysis showed that six kinds of chlorogenic acids were detected in the leaves of 14 *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivars, including neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C. The main components were isochlorogenic acid A, chlorogenic acid and isochlorogenic acid C, but no isochlorogenic acid B was detected in varieties 3, 5, 13 and 14. The contents of 6 chlorogenic acids in the leaves of 14 *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivars were 20.55-54.3 mg·g^{-1} (isochlorogenic acid A), 17.96-32.93 mg·g^{-1} (chlorogenic acid), 4.15-19.49 mg·g^{-1} (isochlorogenic acid C), 0.61-4.61 mg·g^{-1} (neochlorogenic acid), 0.52-3.11 mg·g^{-1} (cryptochlorogenic acid), 0.0-3.17 mg·g^{-1} (isochlorogenic acid B), respectively. The total amount of 6 chlorogenic acids was 43.9-97.8 mg·g^{-1}. The research results suggest that different variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivars contains different contents of chlorogenic acids, and the *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties rich in chlorogenic acids can be used to develop and obtain chlorogenic acids. The resarch can provide a basis for expanding the development and utilization of *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Key words *Stevia rebaudiana* Bertoni, chlorogenic acids, leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivars, XAD-16 resin

甜叶菊（*Stevia rebaudiana* Bertoni）为一种原产于南美亚热带地区的多年生草本植物，我国于上世纪 70 年代引进栽培，目前在我国南北方地区均有种植（丁海荣等，2016）。其叶片中含有多种低热量、高甜度的甜菊糖苷，被誉为最有发展前途的新糖源，已在食品、饮料等行业得到广泛应用（Samueli et al., 2018）。此外，近年来研究也发现甜叶菊提取物具有抗氧化、抗炎、降血糖降血压等多种功效（Kim et al., 2011；刘乃新等，2016），研究表明这些功效可能更多地与与其所含绿原酸等酚酸类物质有关（Molina-Calle et al., 2017）。绿原酸类物质是由咖啡酸与奎尼酸组成的一类缩酚酸类化合物，具有抗菌、抗氧化、抑癌、调控糖脂代谢等多种生物学活性（赵昱等，2006），已被应用于食品、保健品、日用化工等领域，但目前主要从金银花、杜仲叶、咖啡豆等植物中获取绿原酸类物质，原材料来源有限，成本较高（席利莎等，2014）。现有研究表明甜叶菊中除含有高含量的甜菊糖苷外还含有丰富的绿原酸类物质，其整株均含有绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C，以叶片含量最高（付晓等，2014），叶中绿原酸类成分含量高达 52.69 mg·g^{-1}；Karakose et al（2011）采用 LC-MS 在甜叶菊中发现了 24 种奎尼酸和莽草酸的羟基肉桂酸衍生物，额尔敦巴雅尔等（2017）采用 UPLC-QTOF-MS 在甜叶菊水提物中检测出 10 种酚酸类物质，Hande et al.（2015）在甜叶菊叶中检测出 5 种绿原酸类成分，李华丽等（2017）测定不同产地甜叶菊中酚酸类成分含量最高可达 6.726%。

近年来，大孔吸附树脂在天然产物领域应用十分广泛，如王立志等（2014）采用 DM700 树脂用于纯化绿咖啡豆中的绿原酸，熊硕等（2013）选用 NKA-2 树脂对杜仲中绿原酸成分进行了纯化研究，但鲜有树脂纯化处理甜叶菊中绿原酸类成分相关方面的研究报道。在甜叶菊中除含有绿原酸类成分外，还含有碳水化合物、生物碱、植物色素等其它杂质成分（刘乃新等，2016），直接进行分析不仅影响测定结果准确性，也会对检测系统产生较大污染，因此该文以紫外分光光度法测定绿原酸类成分总量，以 HPLC 法测定不同种类绿原酸类成分含量，先筛选合适的大孔吸附树脂对甜叶菊叶中绿原酸类成分纯化前处理，继而对 14 个不同甜叶菊品种叶中所含绿原酸类成分进行比较分析，以期筛选出含有较高含量绿原酸类物质

的甜叶菊品种，为扩大甜叶菊的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

14 个甜叶菊品种是由宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室利用植物培养专用智能温室扦插培育的，包括目前生产上常用的 9 个品种及张虹等（2017）以秋水仙素诱导处理中山二号种子获得的 5 个四倍体品种。甜叶菊叶自然阴干后，粉碎过 40 目筛处理。

1.2 试剂与仪器

绿原酸（批号 MUST-15041814）、隐绿原酸（批号 MUST-17022403）、新绿原酸（批号 MUST-17011001）、异绿原酸 A（批号 MUST-17030621）、异绿原酸 B（批号 MUST-17021602）、异绿原酸 C（批号 MUST-17021603）标准品均购自成都曼斯特生物科技有限公司，咖啡酸（批号 170406）、阿魏酸（批号 170106）标准品购自成都植标化纯生物技术有限公司，质量分数均大于 98%。色谱纯乙腈，Fisher 公司；冰乙酸，天津市永大化学试剂开发中心；水为娃哈哈饮用纯净水；其余试剂均为分析纯。不同型号大孔吸附树脂理化性能参数及生产厂家见表 1。

表 1 不同型号大孔吸附树脂理化性能参数和生产厂家

Table 1 Physical and chemical properties parameters and manufacturers of different types of macroporous adsorption resins

型号 Type	极性 Polarity	比表面积 Surface area（$m^2·g^{-1}$）	平均孔径 Average aperture（A^0）	生产厂家 Manufacturer
AB-8	弱极性 Weak-polar	480~520	130~140	上海华震科技公司 Shanghai Huazhen Technology Co., Ltd.
ADS-7	强极性 Polar	≥100	250~300	天津南开和成科技公司 Tianjin Nankai Hecheng Technology Co., Ltd.
ADS-17	中等极性 Moderate-polar	90~150	250~300	天津南开和成科技公司 Tianjin Nankai Hecheng Technology Co., Ltd.
DM130	中等极性 Moderate-polar	500~550	90~100	山东鲁抗医药股份公司 Shandong Lukang Pharmaceutical Co., Ltd.
D101	弱极性 Weak-polar	500~550	90~100	沧州宝恩化工有限公司 Cangzhou Baoen Chemical Co., Ltd.
XAD-16	非极性 Non-polar	800	150	Rohm & Haas
HP20	非极性 Non-polar	590~600	>200	三菱化学控股株式会社 Mitsubishi Chemical Holdings Co., Ltd.
X-5	非极性 Non-polar	500~600	290~300	上海华震科技公司 Shanghai Huazhen Technology Co., Ltd.

U-5100 型紫外可见分光光度计，日本日立公司；CQ-250-DST 型超声波清洗机，上海跃进医用光学器械厂；DELTA-320 pH 计、AL204 型电子天平，梅特勒-托利多仪器有限公司；RE-52A 旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；SHA-B 双功能水浴恒温振荡器，杰瑞尔电器有限公司；SHB- IV 双 A 循环水式多用真空泵，郑州长城科工贸有限公司；Sorvall ST-8 型离心机，美国 Thermo 公司；Waters 2695 高效液相色谱仪、2998 检测器，沃特世科技（上海）有限公司。

1.3 样品溶液制备

取甜叶菊叶粉末 0.1 g，加 60%乙醇水 5 mL，60 ℃条件下超声提取 25 min，提取 3 次，离心取上清液，合并上清液过滤，收集滤液于 25 mL 容量瓶并定容至刻度，备用。

1.4 紫外分光光度法

参考钟方晓（2005）的紫外分光光度法，以绿原酸为标准品，在波长 327nm 处测定甜叶菊叶中绿原酸类成分的总量。

1.5 高效液相色谱法

借鉴李华丽等（2017）测定甜叶菊中 6 个酚酸类成分的 HPLC 方法并对其优化。

1.5.1 色谱条件

Waters SunFire C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm），流动相 A 为乙腈，B 为 1%乙酸水溶液，梯度洗脱（0~15 min，8% A~17% A，1.0 mL·min^{-1}；15~22.5 min，17% A ~17.5% A，1.0~0.6 mL·min^{-1}；22.5~30 min，17.5% A~18% A，0.6 mL·min^{-1}；30~40 min，18% A~20% A，0.6 mL·min^{-1}；40~42 min，20% A~24% A，0.6~1.0 mL·min^{-1}；42~50 min，24% A~40% A，1.0 mL·min^{-1}；50~65 min，40% A~40.2% A，1.0 mL·min^{-1}），柱温 30 ℃，进样量 10 μL，波长 330 nm。

1.5.2 线性关系

依次取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 标准品适量，加 60%乙醇溶解得混合标准品溶液，按比例分别稀释至相应浓度梯度进行 HPLC 分析。

1.5.3 精密度

取混合对准品溶液重复进样 5 次，以峰面积计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的 RSD 值。

1.5.4 重复性

取甜叶菊叶粉末平行制备 6 份样品溶液进行测定，以峰面积计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的 RSD 值。

1.5.5 稳定性

取甜叶菊样品粉末制备样品溶液，分别在 0、4、8、12、24 h 进行测定，以峰面积计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的 RSD 值。

1.5.6 回收率试验

分别取一定体积的混合标准品溶液加入甜叶菊样品中，平行制备 5 份样品溶液进行 HPLC 分析，以峰面积计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的回收率。

1.6 树脂型号的筛选

1.6.1 树脂预处理

取 8 种型号的大孔吸附树脂适量，先向各种树脂中加入无水乙醇浸泡 24 h，然后用去离子水洗净乙醇至无醇味为止；再依次用 4% HCl 溶液和 2% NaOH 溶液处理各树脂，浸泡 2-4 h 后洗至出水 pH 为中性，备用。

1.6.2 不同型号树脂之间的比较

以紫外分光光度法所测绿原酸类成分的总量为指标，比较八种不同极性的大孔树脂对甜叶菊叶中绿原酸类成分的吸附-解析性能。取 8 种预处理好的树脂各 1.0 g，分别加入浓度为 C_0 的供试品溶液 10 mL，恒温（25 ℃）振荡吸附 24 h，测定吸附后溶液的浓度 C 值，滤过；然后向各树脂中分别加入 10 mL 水，恒温（25 ℃）振荡 10 min，重复两次；水洗后向各树脂中分别加入 60%乙醇 25 mL，25 ℃恒温振荡解吸 24 h，测定解析后绿原酸类物质浓度 C_1 值，依据下述公式（Liu et al.，2017）计算各树脂吸附量 Q（$mg \cdot g^{-1}$）、吸附率 E（%）和解析率 D（%）：

$E=[(C_0-C)/C_0]\times 100\%$　　$Q=(C_0-C)V/W$　　$D=[C_1V_1/(C_0-C)V]\times 100\%$

C_0 为吸附前绿原酸类物质浓度（$mg \cdot mL^{-1}$），C 为吸附后绿原酸类物质浓度（$mg \cdot mL^{-1}$），C_1 为解吸后绿原酸类物质浓度（$mg \cdot mL^{-1}$），V 为吸附液体积（mL），W 为树脂重量（g），V_1 为解吸液体积（mL）

1.7 XAD-16 树脂吸附与解析性能的优化

1.7.1 样品溶液浓度对 XAD-16 树脂吸附性能的影响

以紫外分光光度法测定样品溶液的绿原酸类成分总量，考察不同样品溶液浓度对 XAD-16 树脂吸附性能的影响。称取 1.0 g 预处理好的 XAD-16 树脂 5 份加入 5 只具塞锥形瓶内，再分别加入 0.3、 0.6、 1.2、 2.4、 3.6 $mg \cdot mL^{-1}$ 浓度的样品溶液 10 mL 于 25 ℃恒温振摇吸附 24 h 后，测定不同样品溶液浓度条件下 XAD-16 对甜叶菊叶中绿原酸类物质的吸附率。

1.7.2 样品溶液 pH 对 XAD-16 树脂吸附性能的影响

称取 1.0 g 预处理好的 XAD-16 树脂 3 份加入 3 只具塞锥形瓶内，将样品溶液（pH 5.6）的 pH 值调节为 pH 5.0、pH 4.0、pH 3.0，各取 10 mL 加入锥形瓶内于 25 ℃恒温振摇吸附 24 h 后依次进行 HPLC 分析，考察不同 pH 条件下 XAD-16 对甜叶菊叶中绿原酸类成分的吸附能力。

1.7.3 乙醇体积分数对 XAD-16 树脂解析性能的影响

以紫外分光光度法测定不同体积分数乙醇解析液中绿原酸类成分总量。称取 1.0 g 预处理好的 XAD-16 树脂 5 份加入具塞锥形瓶内，分别加入样品溶液（1.2 $mg \cdot mL^{-1}$，pH 3）10 mL，25℃恒温振摇吸附 24 h 后先用 10 mL 水处理两次，水洗后再分别加入体积分数为 10%、30%、60%、70%、90%的乙醇各 25 mL，25 ℃恒温振摇解析 24 h 后测定不同乙醇浓度条件下的解析率。

1.8 14 个甜叶菊品种叶中绿原酸类成分含量测定

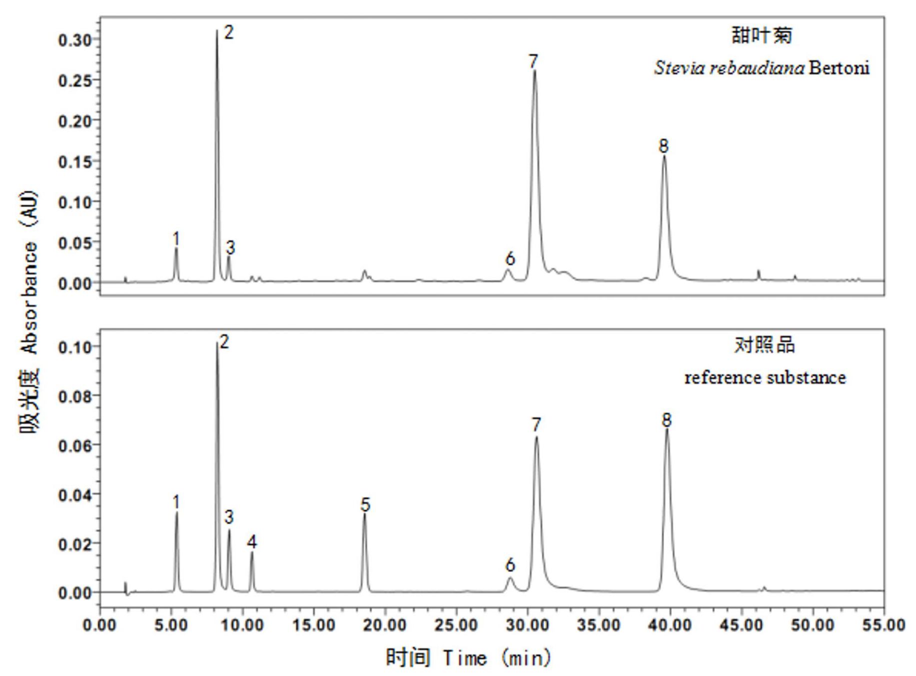
分别取 14 个不同品种甜叶菊叶粉末各 0.1 g，按 1.3 项方法制备样品溶液，在上述静态吸附-解析实验的基础上，采用 XAD-16 树脂前处理后以 HPLC 法测定各甜叶菊品种叶中所含绿原酸类成分。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱法

2.1.1 HPLC 效果图

在 1.5.1 项所建立的色谱条件下对照品及甜叶菊样品的色谱图如图 1 所示，可以看出该色谱条件下新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 八种酚酸对照品可获得较好的分离效果，在甜叶菊叶中也能检测出新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 六种酚酸类成分。



注：1-新绿原酸；2-绿原酸；3-隐绿原酸；4-咖啡酸；5-阿魏酸；6-异绿原酸 B；7-异绿原酸 A；8-异绿原酸 C。

Note: 1-Neochlorogenic acid; 2-Chlorogenic acid; 3-Cryptochlorogenic acid; 4-Caffeic acid; 5-Ferulic acid; 6-IsoChlorogenic acid B; 7-IsoChlorogenic acid A; 8-IsoChlorogenic acid C.

图 1 对照品和甜叶菊样品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substance and *Stevia rebaudiana* Bertoni sample

2.1.2 方法学考察

以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标进行线性回归，对线性关系进行考察，结果为新绿原酸 y=35197x+5663.3，r^2=0.9994，线性范围 1.25~20.0 μg·mL^{-1}；绿原酸 y=33963x+74214，r^2=0.9999，线性范围 16.66~266.66 μg·mL^{-1}；隐绿原酸 y=26205x-6346.7，r^2=0.9998，线性范围 1.46~23.33 μg·mL^{-1}；异绿原酸 B y=30902x+2352.9，r^2=0.9999，线性范围 1.46~23.33 μg·mL^{-1}；异绿原酸 A y=59164x-15903，r^2=0.9999，线性范围 18.33~293.33 μg·mL^{-1}；异绿原酸 C y=67461x-60438，r^2=0.9999，线性范围 8.75~140.0 μg·mL^{-1}。

精密度试验中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的 RSD 值在 0.53%~0.91%之间，表明该仪器精密度良好；重复性试验中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的 RSD 值在 0.93%~1.81%之间，表明该方法重复性良好；稳定性试验中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的 RSD 值在 0.95%~1.74%之间，表明样品溶液在 24 h 内保持稳定；回收率试验中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的平均回收率在 95.1%~104.8%之间。

2.2 树脂型号的筛选

以紫外分光光度法所测绿原酸类成分的总量为指标，结果表明八种不同极性的树脂中强极性树脂 ADS-7 对甜叶菊叶中绿原酸类成分吸附率和吸附量最高，但其解析率过低；非极性的 XAD-16 树脂吸附能力略低于 ADS-7 树脂，却表现出最佳解吸附能力（表 2），因此选择 XAD-16 树脂对甜叶菊叶中绿原酸类物质前处理。

表 2 不同型号树脂吸附与解析性能的比较

Table 2 Adsorption and desorption capacities of different macroporous resins

树脂型号 Resin type	吸附量 Adsorption capacity （mg·g^{-1}）	吸附率 Adsorption ratio （%）	解析率 Desorption ratio （%）
XAD-16	11.90	88.0	96.6
AB-8	11.40	84.4	86.4
HP-20	11.34	84.0	89.3
X-5	11.30	83.7	85.4
D101	11.20	83.0	84.6
DM-130	10.61	79.0	74.2
ADS-7	13.05	96.0	19.2
ADS-17	5.50	40.3	38.7

2.3 XAD-16 吸附与解析性能的优化

2.3.1 样品溶液浓度对 XAD-16 吸附性能的影响

0.3、 0.6、 1.2、 2.4、 3.6 mg·mL^{-1} 5 个不同样品溶液浓度条件下 XAD-16 对甜叶菊中绿原酸类成分的吸附率分别为 89.0%、88.5%、90.1%、85.2%、76.0%。可以看出，上样浓度低于 1.2mg·mL^{-1} 时对 XAD-16 树脂的吸附能力几乎没有影响，当上样浓度大于 1.2 mg·mL^{-1} 时，XAD-16 树脂吸附率逐渐下降。因此，样品溶液浓度以 1.2 mg·mL^{-1} 最佳。

2.3.2 样品溶液 pH 对 XAD-16 树脂吸附性能的影响

当我们采用 HPLC 分析 XAD-16 吸附前后样品溶液中绿原酸类成分的情况后，发现 XAD-16 对不同种类绿原酸类成分吸附能力不同。如图 2 所示，吸附前可检测到样品溶液（pH 5.6）中含有多种绿原酸类成分，吸附后几乎检测不到异绿原酸 A、异绿原酸 C 等成分（对应的色谱峰为 6、7、8），只检测到绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸成分（对应的色谱峰为 1、2、3），表明在 pH 5.6 时 XAD-16 对其中的异绿原酸 A、异绿原酸 C 等成分的吸附能力强，而对绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸成分的吸附能力则较差。绿原酸类化合物是一类含有羟基和邻二酚羟基的有机酚酸，研究表明酸性条件下有利于酚酸类化合物在大孔吸附树脂上的吸附（Zhang et al., 2008），为此我们进一步通过调节样品溶液 pH 考察甜叶菊叶中绿原酸类成分在 XAD-16 树脂上的吸附能力。

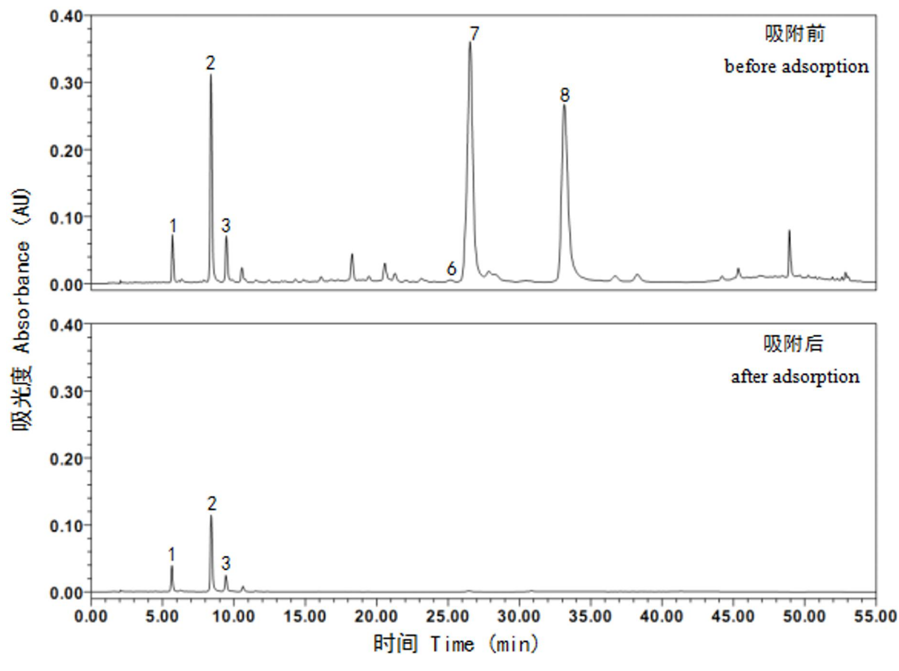


图 2 XAD-16 树脂吸附前后的样品溶液（pH 5.6）HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatogram of sample solution (pH 5.6) before and after adsorption on XAD-16 resin

通过考察样品溶液 pH 对 XAD-16 树脂吸附性能的影响（图 3），发现不同 pH 条件下异绿原酸 A、异绿原酸 C 等成分在 XAD-16 上均有较好的吸附效果，XAD-16 对绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸的吸附能力随 pH 值降低逐渐增强，表现在随着 pH 值的降低，吸附后样品溶液中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸成分含量逐渐降低，其中绿原酸含量降低最为明显（对应的色谱峰为 2）。提示经 pH3 处理后，总体上增强了 XAD-16 对甜叶菊叶中绿原酸类成分的吸附能力，因此选择 pH 3 条件下进行甜叶菊叶中绿原酸类成分的吸附。

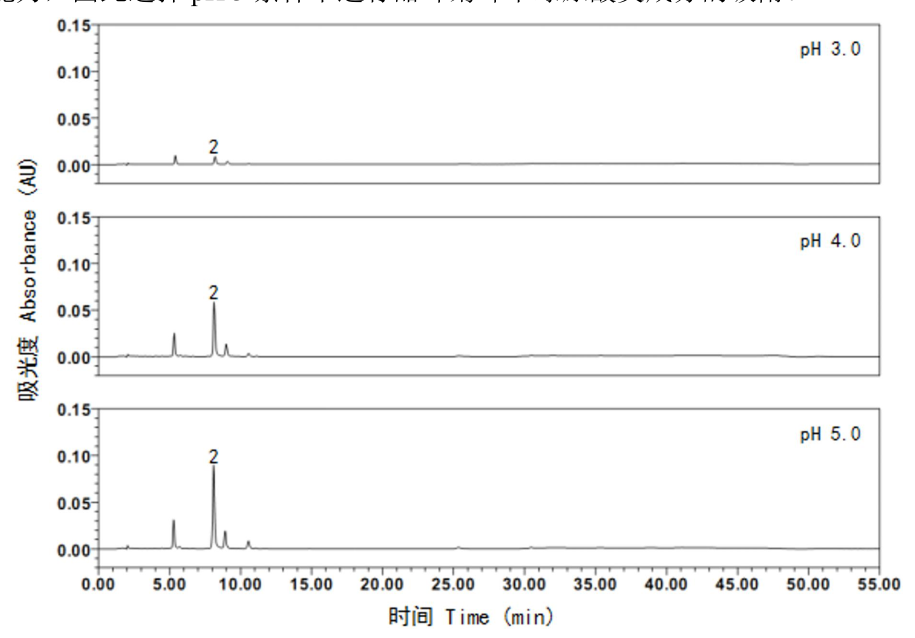


图 3 不同样品溶液 pH 对 XAD-16 树脂吸附性能的影响

Fig. 3 Effect of different solution pH on the adsorption capacity of XAD-16

2.3.3 乙醇体积分数对 XAD-16 树脂解析性能的影响

10%、 30%、60%、70%、90% 5 个不同乙醇浓度条件下 XAD-16 树脂的解析率分别为 12.8%、52.6%、80.7%、92.8%、88.2%。结果表明，不同体积分数的乙醇对绿原酸类物质的解析产生较大影响，随着乙醇体积分数的增加，绿原酸类物质的解析率先上升后下降，70%乙醇时最高达到 92.8%。乙醇体积分数较低时，随着解析液极性性质逐渐减弱，有利于目标组分的洗脱，而过高体积分数的乙醇会把杂质成分洗脱下来从而导致解析率下降（Sun et al., 2013）。因此，选择 70%体积分数的乙醇作为洗脱液进行解吸附。

2.4 14 个甜叶菊品种叶中绿原酸类成分含量测定

以 HPLC 法测定 14 个不同品种甜叶菊中绿原酸类物质，结果见表 3。可以看出，在成分种类方面，14 个甜叶菊品种中都含有新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C，其中主要组成成分均为绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C，而新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B 含量相对较少，在品种 3、5、13、14 中没有检测出异绿原酸 B 成分。14 个品种中 6 种绿原酸类物质总量介于 4.39%~9.78%之间，含量最高的为品种 1，其中异绿原酸 A 含量在 20.55~54.3 mg·g^{-1}之间，含量最高的为品种 3；绿原酸含量在 17.96~32.93 mg·g^{-1}之间，含量最高的为品种 10；异绿原酸 C 含量在 4.15~19.49 mg·g^{-1}之间，含量最高的为品种 8；新绿原酸含量在 0.61~4.61 mg·g^{-1}之间，含量最高的为品种 1；隐绿原酸含量在 0.52~3.11 mg·g^{-1}之间，含量最高的为品种 1；异绿原酸 B 含量在 0~3.17mg·g^{-1}之间，含量最高的为品种 1。

表 3 14 个甜叶菊品种叶中所含绿原酸类物质

Table 3 Chlorogenic acids contained in 14 *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties leaves

品种编号 Variety No.	新绿原酸 Neochlorogenic acid	绿原酸 Chlorogenic acid	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	异绿原酸 B IsoChlorogenic acid B	异绿原酸 A IsoChlorogenic acid A	异绿原酸 C IsoChlorogenic acid C	总量 Total
	mg·g^{-1}						
1	4.61	30.44	3.11	3.17	39.88	16.58	97.8
2	0.92	25.86	2.06	1.69	24.01	17.57	72.1
3	0.67	21.11	1.07	-	54.30	8.05	85.2
4	1.61	27.53	2.01	1.92	33.41	12.92	79.4
5	2.04	18.99	1.48	-	37.44	6.11	66.1
6	0.92	22.28	1.38	2.10	43.74	12.76	83.2
7	1.24	21.45	1.52	1.61	48.40	9.39	83.6
8	2.47	22.60	2.98	3.10	26.55	19.49	77.2
9	1.62	25.23	2.11	2.82	33.10	17.22	82.1
10	0.61	32.93	0.52	0.61	27.26	6.08	68.0
11	2.21	25.15	1.70	2.57	34.26	11.00	76.9
12	3.08	22.53	2.15	2.40	36.30	12.57	79.0
13	3.32	25.10	1.32	-	51.26	13.23	94.2
14	0.65	17.96	0.61	-	20.55	4.15	43.9

注：“-”表示未检测出。 Note: "-" means not detected.

3 讨论

大孔吸附树脂具有工艺简单、成本相对较低以及可重复使用等优点，已被广泛应用于多酚类、黄酮类等天然产物的分离纯化（黄燕秋，2018），该文首次采用大孔吸附树脂对甜叶菊叶中绿原酸类成分进行纯化处理，在8种不同型号的树脂中XAD-16具有较大的比表面积，对甜叶菊叶中绿原酸类成分总体上表现出较好吸附及解吸附能力。大孔吸附树脂以物理吸附为主，该研究发现XAD-16对不同种类绿原酸类成分吸附能力不同，非极性树脂XAD-16易于吸附极性相对较弱的异绿原酸A、异绿原酸C等组分，而对绿原酸、新绿原酸等极性较强的组分吸附能力较差，通过比较不同pH值对XAD-16树脂吸附性能的影响，发现XAD-16对甜叶菊叶中绿原酸类成分的吸附能力随pH降低逐渐提升，样品溶液pH 3处理后XAD-16对绿原酸、新绿原酸等组分的吸附能力显著提高，总体上增强了XAD-16对甜叶菊叶中绿原酸类成分的吸附能力。此外，确立了XAD-16树脂最佳处理样品溶液浓度为1.2 mg·mL^{-1}，最佳解析液乙醇体积分数为70%。

绿原酸物质是药用植物中非常重要的功效成分（王丽萍等，2011），该研究发现品种不同会对甜叶菊叶中绿原酸类物质产生较大影响，绿原酸类成分种类及含量均会受到品种差异性的影响。14个品种中多数均含有新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸C、异绿原酸B六种酚酸类成分，而少数品种中只含有新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸C五种酚酸类成分；14个品种中绿原酸类成分总量最高的品种可达97.8 mg·g^{-1}，最低仅为43.9 mg·g^{-1}，不同种类绿原酸类成分在不同品种中含量高低不同。目前甜叶菊的主要用途是作为糖草使用生产甜菊糖苷甜味剂，有必要对绿原酸类物质含量较高的甜叶菊品种进一步开发研究，丰富绿原酸类物质原材料来源的同时还可促进甜叶菊综合利用。

参考文献

DING HR, HONG LZH, ZHAO BQ, et al., 2016. Main uses of *Stevia rebaudianum* and current problems in production[J]. Sugar Crop Chin, 38(6): 77-78. [丁海荣，洪立洲，赵宝泉，等，2016. 甜叶菊主要用途及当前生产中存在的问题[J]．中国糖料，38(6)：77-78．]
EERDUN BAYAER, ZHAO PY, JIAO LW, et al., 2017. The Study of the Differences of Compositions between Water Extract and Flocculation Supernatant from *Stevia rebaudiana*[J]. Food Res Dev, 38(18): 143-149. [额尔敦巴雅尔，赵鹏宇，焦利卫，等，2017．甜叶菊水提物和絮凝上清液成分差异研究[J]．食品研究与开发，38(18)：143-149．]
FU X, YIN ZHP, SHANG GXCH, et al., 2014. HPLC simultaneous determination of three caffeoylquinic acids in leaves of *Stevia rebaudianum* Bertoni[J]. Food Sci Technol, 39(8): 276-280. [付晓，尹忠平，上官新晨，等，2014．HPLC 法同时测定甜叶菊中 3 种绿原酸类化合物[J]. 食品科技，39(8)：276-280．]
HANDE KS, ANJA M, NIKOLAI K, 2015. Profiling and Quantification of Phenolics in *Stevia rebaudiana* Leaves [J]. J Agric & Food Chem, 63(41): 9188-9198.
HUANG YQ, 2018. The Review on Macroporous Adsorption Resin Application in the Purification studies of Traditional Chinese Medicine[J]. Guangdong Chem Ind, 45(8): 130-132. [黄燕秋，2018．孔吸附树脂在中药纯化中的应用进展[J]．广东化工，45(8)：130-132．]
KARAKOSE H, JAISWAL R, KUHNERT N, 2011. Characterization and quantification of hydroxycinnamate derivatives in *Stevia rebaudiana* leaves by LC-MSn [J]. J Agri & Food Chem, 59(18): 10143-10150.
KIM IS, YANG M, LEE O H, et al., 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts [J]. LWT - Food Sci Technol, 44(5): 1328-1332.
LIU NX, ZHANG WB, WU ZD, et al., 2016. Progress in Secondary Metabolites and Biological Functions of *Stevia rebaudiana*[J]. Sugar Crop Chin, 38(3): 59-60. [刘乃新，张文彬，吴则东，等，2016．甜叶菊次生代谢产物及其生物功能研究进展[J]．中国糖料，38(3)：59-60．]
LI HL, YUAN J, YU RH, et al., 2017. Determination of six phenolic acids in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni by HPLC[J]. Chin J Pharm Anal, 37(2): 219-223. [李华丽，袁君，郁荣华，等，2017．HPLC 法测定甜叶菊中 6 个酚酸类成分含量[J]．药物分析杂志，37(2)：219-223.]
LIU B, DONG B, YUAN X, et al., 2016. Enrichment and separation of chlorogenic acid from the extract of *Eupatorium adenophorum* Spreng by macroporous resin [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 1008(1): 58-64.
MOLINA-CALLE M, PRIEGO-CAPOTE F, LUQUE DE CASTRO MD, 2017. Characterization of *Stevia* leaves by LC–QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts [J]. Food Chem, 219(15): 329-338.
SAMUELl P, AYOOB KT, MAGNUSONB A, et al., 2018. *Stevia* Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential [J]. J Nutr, 148(7): 1186-1205.
SUN L, GUO Y, FU C, et al., 2013. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples [J]. Food Chem, 136(2): 1022-1029.
WANG L ZH, HU XM, FU QSH, et al., 2014. Studies on the purification technology of total chlorogenic acid in green coffee beans[J]. Chin Food Add, (7): 123-128. [王立志，胡晓梅，付其胜，等，2014．绿咖啡豆中总绿原酸的纯化工艺研究[J]．中国食品添加剂，(7)：123-128．]
WANG LP, GUO D, WANG G, et al., 2011. Advancement of Chlorogenic Acid in Traditional Chinese Medicine[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 22(4): 961-963. [王丽萍，郭栋，王果，等，

2011．中药绿原酸的研究进展[J]．时珍国医国药，22(4)：961-963．]
XI LS, MU TH, SUN HN, 2014. Progresses in the research of chlorogenic Acids[J]. Acta Agric Nucl Sin, 28(2): 292-301. [席利莎，木泰华，孙红男，2014．绿原酸类物质的国内外研究进展[J]．核农学报，28(2)：292-301．]
XIONG SH, CUI L, LIU ZHH, et al., 2013. Optimization by Orthogonal Array Design of Separation and Purification of Chlorogenic Acid from *Eucommia ulmoidues* Leaves by Macroporous Adsorption Resin[J]. Food Science, 34(16): 23-26. [熊硕，崔丽，刘仲华，等，2013．正交试验优化大孔吸附树脂分离纯化杜仲绿原酸[J]．食品科学，34(16)：23-26．]
ZHAO W, ZHAO J, LI XP, et al., 2006. Advances in caffeoylquinic acid research[J]. J Chin Mater Med, 31(11): 869-874. [赵昱，赵军，李湘萍，等，2006. 咖啡酰奎尼酸类化合物研究进展[J]. 中国中药杂志，31(11)：869-874．]
ZHANG H, LIU X, HU J, et al., 2017. Induction and Identification of Polyploidy in *Stevia rebaudiana*[J]. Mol Plant Breed, 15(3): 1010-1013. [张虹，刘祥，虎娟，等，2017．甜叶菊多倍体诱导[J]．分子植物育种，15(3)：1010-1013．]
ZHONG FX, 2005. Comparison of Method for Determination of Chlorogenic Acid and Isochlorogenic Acid in Honeysuckle by High Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Spectrophotometry[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 16(3): 212-212. [钟方晓，2005．高效液相及紫外分光光度法测定金银花中绿原酸和异绿原酸含量方法学比较[J]．时珍国医国药，16(3)：212-212．]
ZHANG B, YANG R, ZHAO Y, et al., 2008. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins [J]. J Chromatogr, 867(2): 253-258.